

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

N° 78 06162

(54) **Produit réactif dérivé de polymères renfermant des groupements thiols et son application.**

(61) Classification internationale (Int. Cl.³). **C 09 K 3/00.**

(22) Date de dépôt **3 mars 1978, à 15 h 19 mn.**

(33) (32) (31) **Priorité revendiquée : Demande de brevet déposée en Suède le 4 mars 1977, n. 77 02463-6
au nom de la demanderesse.**

(41) Date de la mise à la disposition du
public de la demande **B.O.P.I. — «Listes» n. 39 du 29-9-1978.**

(71) **Déposant : Société dite : PHARMACIA FINE CHEMICALS AB. Société de droit suédois,
résidant en Suède.**

(72) **Invention de : Jan Per Erik Carlsson, Rolf Erik Axel Verner Axén, Hakan Nils Yngve
Drevin et Göran Einar Samuel Lindgren.**

(73) **Titulaire : Idem. (71)**

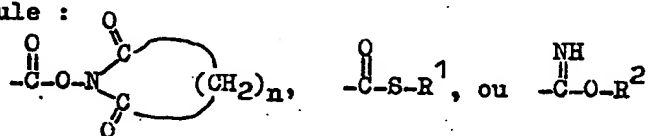
(74) **Mandataire : Cabinet Madeuf, Conseils en brevets.**

La présente invention concerne des produits réactifs dérivés de polymères renfermant des groupements HS, ces dérivés pouvant être utilisés par exemple comme agents de formation de thiols ou agents de thiolation ou comme vecteurs, par exemple d'enzymes ou autres protéines, etc.

Les produits de l'invention sont caractérisés en ce qu'un certain nombre de groupements HS sont transformés en groupements disulfure de formule générale :



dans laquelle A représente un résidu hydrocarboné renfermant de 1 à 10 atomes de carbone, de préférence de 1 à 6 atomes de carbone, et dans laquelle Z représente un groupement de formule :



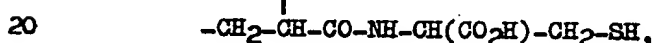
ou des dérivés d'addition salés acides des groupements précédemment mentionnés dans lesquels n est égal à 2 ou 3, R¹ représente le groupement pyridyle-2, nitro-5 pyridyle-2 ou pyridyle-4 et R² représente le groupement méthyle ou éthyle.

Les polymères peuvent être insolubles ou bien solubles dans des liquides aqueux. Ils peuvent être préparés de façon synthétique ou peuvent présenter une origine naturelle et renfermer des groupements de formule -SH. Ce peuvent être des groupements de nature organique ou partiellement minérale. On peut citer, comme ensemble particulièrement important de polymères, celui constitué par des dérivés, renfermant des groupements HS, de biopolymères tels que des polysaccharides, des protéines et des polypeptides. Le polymère peut être réticulé suivant un réseau insoluble dans l'eau mais, toutefois, ce polymère peut gonfler dans l'eau. On peut citer, comme exemples de polymères insolubles dans l'eau, des dérivés, renfermant des groupements HS, de l'agarose, du dextranne réticulé ou de l'amidon réticulé (par exemple réticulé avec de l'épichlorhydrine pour former un gel insoluble), de la cellulose ou d'autres polysaccharides insolubles dans l'eau ou encore de verres. On peut mentionner, comme exemples particuliers de polymères solubles dans l'eau, des dérivés renfer-

mant des entités HS, du dextrane, de l'amidon ou d'autres polysaccharides solubles dans l'eau. On peut encore indiquer, comme autres exemples de polymères également intéressants, des protéines naturelles ou des protéines modifiées solubles ou insolubles ou bien encore des polypeptides présentant des entités HS libres. Dans de nombreux cas, il est avantageux d'utiliser des dérivés, renfermant des groupements HS, de substances polymères insolubles dans l'eau et gonflant dans l'eau, par exemple de substances polymères réticulées renfermant des groupements hydrophiles tels que des groupements hydroxyles.

Il existe de nombreux exemples de polymères renfermant des groupements HS. On peut, par exemple, citer le polymère décrit dans la publication "Acta.Chem.Scand., Vol.17 (1963), pages 2610 à 2621.

Certains de ces polymères, renfermant des groupements HS libres ou des groupements disulfure qui peuvent être facilement transformés en groupements HS libres, sont disponibles dans le commerce. On peut citer à cet effet des copolymères de l'acrylamide renfermant le groupement de formule :



à savoir par exemple le produit de marque déposée Enzacryl Polythiol, commercialisé par la Société Koch-Light Laboratories Ltd., Angleterre, ainsi que des verres substitués avec le groupement de formule :



à savoir, par exemple, le produit de marque Corning Thiol CPG, commercialisé par la Société Corning Glass Co, Etats-Unis d'Amérique.

On peut citer, comme autres exemples, l'agarose substitué avec le groupement de formule $\text{—O—CH}_2\text{—CH(OH)—CH}_2\text{—SH}$ et l'agarose substitué avec des groupements glutathione renfermant des entités HS libres, qui sont obtenus en réduisant des dérivés du disulfure de pyridyle-2 et d'agarose qui sont disponibles dans le commerce (produits de marques déposées Thiopropyl-Sépharose 6B et Thiol-Sépharose activé 4B, commercialisés par la Société Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Suède).

Dans le cas des polymères concernés, le groupement HS peut être lié à un atome de carbone présent dans une chaîne

polymère du squelette de base du polymère. Toutefois, de préférence, ce sont des polymères choisis pour lesquels le groupement HS est lié à un atome de carbone présent dans un groupe qui constitue une ramification d'un polymère du squelette de base du polymère et ce groupement est de ce fait plus accessible aux réactifs. L'atome de carbone auquel le groupement HS est lié peut être celui d'un groupement aliphatique ou d'un groupement aromatique du polymère et il est lui-même de préférence relié directement à au moins un atome de carbone.

Les autres liaisons du premier atome de carbone mentionné sont de préférence saturées avec des atomes d'hydrogène. Il existe avantageusement des groupements HS choisis dans le groupement de formule $-\text{CH}_2-\text{SH}$ ou dans un groupement de formule >C-SH , dont l'atome de carbone fait partie d'un cycle aromatique tel qu'un cycle benzénique. De préférence, le polymère renferme également au moins un groupement de formule $-\text{C-SH}$, dont l'une des liaisons restantes de l'atome de carbone est dirigée vers un autre atome de carbone et dont les autres liaisons sont dirigées vers des atomes de carbone et/ou d'hydrogène. Ce qui a été indiqué ci-dessus en ce qui concerne la liaison du groupement HS à un atome de carbone dans le polymère peut être également appliqué au groupement de formule $-\text{S-S-A-Z}$ des nouveaux dérivés polymères de l'invention.

Les dérivés réactifs de l'invention peuvent être par exemple préparés en réalisant la thiolation d'un polymère de base qui ne renferme pas de groupements ou entités HS, d'une façon connue, par exemple par une réaction d'amination suivie d'une autre réaction avec un réactif de thiolation tel qu'un thiolimide ou une thiolactone de N-acétylhomocystéine, dans le cas de polymères renfermant des groupements hydroxyles et par réaction avec un agent bi-fonctionnel de formule



dans laquelle R^1 , A et Z représentent les mêmes groupements que précédemment.

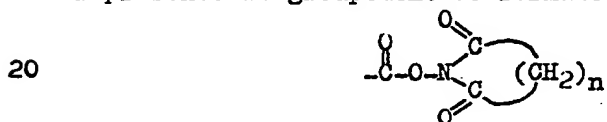
Lorsque des groupements amine ou des groupements thiol sont déjà présents dans le polymère, les étapes correspondantes de la séquence de réaction indiquée ci-dessus peuvent être

omises.

Les dérivés réactifs de l'invention peuvent également être préparés en introduisant, dans le polymère de base, des groupements de formule $R^1-S-S-A-$ dans laquelle R^1 et A représentent les mêmes groupements que précédemment. On fait ensuite réagir le polymère ainsi modifié avec un réactif de formule $HS-A-Z$, A et Z représentant les mêmes groupements que précédemment. Le réactif de formule $HS-A-Z$ peut être préparé à partir d'un corps de formule $R^1-S-S-A-A$, par réduction dans des conditions telles que la structure de Z ne soit pas transformée.

Les composés de formule $R^1-S-S-A-Z$ (formule I) peuvent être préparés de différentes façons (voir la demande de brevet français déposée par la Demanderesse le même jour que la présente demande). Les procédés de préparation de ces composés qui sont considérés comme les plus avantageux à l'heure actuelle sont les suivants :

Les composés de formule $R^1-S-S-A-Z$, dans laquelle Z représente le groupement de formule :



sont obtenus en faisant réagir un disulfure de formule :



dans laquelle R^1 et A représentent les mêmes groupements que précédemment, avec une N-hydroxysuccinimide, lorsque $n = 2$ (ou le composé analogue avec $n = 3$ lorsqu'on désire obtenir des composés pour lesquels $n = 3$), en présence d'un agent de condensation.

La réaction est effectuée dans un solvant organique, à une température comprise entre 10 et 30°C. On peut citer, comme exemples de solvants appropriés, le chlorure de méthylène, l'acétate d'éthyle et le dioxane. Le temps de réaction varie en fonction du choix des réactifs et de la température de réaction.

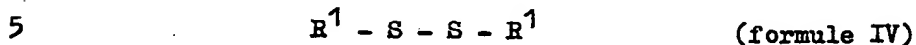
L'agent de condensation employé dans ce cas peut être l'un de ceux utilisés couramment pour effectuer des réactions d'estérification, par exemple le N-N'-dicyclohexylcarbodi-imide.

Le réactif de départ de formule II peut être préparé en

faisant réagir un acide mercapto-alcoyl-carboxylique de formule :



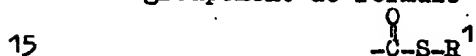
avec un disulfure de dipyridyle de formule :



formules dans lesquelles A et R^1 représentent les mêmes groupements que précédemment.

Cette réaction est effectuée dans un solvant organique, à une température comprise entre 10 et 30°C. On peut citer, comme exemples de solvants appropriés, l'éthanol, l'acétate d'éthyle et le dioxane. Le temps de réaction varie en fonction du choix des réactifs et de la température de réaction.

Les composés de formule I dans laquelle Z représente le groupement de formule :



sont préparés en faisant réagir un disulfure de formule II (ci-dessus) avec la pyridine-thione correspondante en présence d'un agent de condensation, dans un solvant organique, à une température initialement basse, par exemple de -20°C, pendant une période environ comprise entre 1 et 2 heures, puis à température ambiante (par exemple à 20°C). On peut citer, comme exemples de solvants appropriés, le chlorure de méthylène, l'acétate d'éthyle et le dioxane. L'agent de condensation utilisé est de préférence constitué par le N-N'-dicyclohexylcarbodi-imide.

Le produit de départ est avantageusement constitué par un mélange obtenu en faisant réagir un composé de formule III avec un composé de formule IV.

Des composés de formule I, dans laquelle Z représente le groupement de formule $\begin{array}{c} \text{NH} \\ \parallel \\ -\text{C}-\text{O}-\text{R}^2 \end{array}$, sont préparés en faisant réagir, dans un solvant organique, un thiolimidate de formule : $\text{HS}-\text{A}-\begin{array}{c} \text{NH} \\ \parallel \\ \text{C} \end{array}-\text{O}-\text{R}^2$, dans laquelle R^2 et A représentent les mêmes groupements que précédemment, avec un disulfure de dipyridyle de formule $\text{R}^1-\text{S}-\text{S}-\text{R}^1$, dans laquelle R^1 représente les mêmes groupements que précédemment. On peut citer, comme exemple de solvant organique approprié à cet effet, du méthanol ren-

fermant sensiblement 10 % d'acide acétique glacial.

A l'aide des dérivés de l'invention, des composés organiques de poids moléculaire faible, des peptides, des protéines, des hydrates de carbone, etc., qui renferment des groupements amine ou des entités de formule HS- ou HO- pouvant réagir avec le groupement 2, peuvent être liés de façon covalente au polymère par un ou plusieurs desdits groupements ou entités, puis coupés de ce polymère par rupture du pont -S-S-, par exemple par une réaction de réduction ou par une réaction d'échange thiol-disulfure. Ainsi, si le composé d'addition polymère est traité avec un agent réducteur, par exemple un thiol de faible poids moléculaire, le composant lié est libéré sous une autre forme et renferme alors une ou plusieurs entités thiol. A ce propos, il est tout particulièrement important que les dérivés de l'invention puissent être liés l'un à l'autre avec des substances renfermant des groupements amine, ce qui permet d'obtenir une liaison relativement stable au niveau des sites d'addition.

Si le polymère vecteur est un polymère insoluble, par exemple de l'agarose, du dextrane réticulé ou du verre, il constitue un réactif de thiolation pour des composants renfermant des groupements amine, par exemple des protéines.

La réaction de thiolation avec un tel réactif (en phase solide) présente certains avantages évidents par comparaison aux techniques connues qui sont habituellement mises en oeuvre dans des ensembles homogènes solubles. Par exemple, le produit obtenu est plus uniforme, notamment en ce qui concerne son degré de thiolation. Après avoir formé le gel constitué par le produit d'addition, toute la matière qui n'a pas été immobilisée (c'est-à-dire qui n'a pas été modifiée) est éliminée par lavage avant que les molécules modifiées soient libérées par réduction. Cela signifie que la matière désorbée renferme au moins un groupement thiol. Des procédés connus de thiolation de protéine (utilisant par exemple une thiolactone de N-acétyl-homocystéine ou des thiolimidates) conduisent souvent à des mélanges de produits hétérogènes tels que certaines molécules peuvent renfermer plusieurs groupements thiol et d'autres aucun, même si l'analyse montre une teneur moyenne en groupements thiol correspondant à celle recherchée. Il est également dif-

ficile de séparer les produits thiolés des produits non thiolés en utilisant des procédés connus de séparation. Dans certaines applications, par exemple en préparant des dérivés de poids moléculaire élevé de protéines thiolées, il est fondamental que la matière thiolée soit aussi homogène que possible. La thiolation en phase solide réalisée de cette façon doit également permettre d'obtenir des conditions stériques particulières telles que certains groupements amine exposés soient préférentiellement transformés dans les molécules où l'on désire réaliser la thiolation.

Des gels dérivés du type précédemment mentionné et présentant des structures imidates et esters peuvent également conduire à la formation de vecteurs ou supports activés de façon appropriée pour des enzymes immobilisantes et autres protéines ou polypeptides.

Ce qui présente un intérêt tout particulier, c'est la possibilité de séparer de son support ou vecteur par réduction ou par lavage une enzyme liée lorsqu'elle a perdu son activité et de réutiliser le vecteur ou support après l'avoir soumis à une opération de régénération. L'application des techniques d'immobilisation d'enzymes à l'échelle industrielle a été retardée du fait des coûts élevés du support ou vecteur d'enzymes et également du fait que lesdits supports doivent être éliminés lorsque l'enzyme a été désactivée du fait que la majorité des procédés d'immobilisation conduisent à des liaisons covalentes stables qui ne sont pas facilement rompues.

Diverses autres caractéristiques de l'invention ressortent d'ailleurs de la description détaillée qui suit, sous forme d'exemples non limitatifs.

30 EXEMPLE 1

Synthèse de dérivés de l'agarose renfermant des entités esters du type N-hydroxysuccinimide liées par des ponts disulfure :

Du thioisulfate de Sepharose 4B (marque déposée), (15 g de gel sédimenté), présentant un degré de substitution correspondant sensiblement à 100 micromoles de groupement thiosulfate par gramme de gel séché, est préparé à partir de Sepharose 4B (perles d'agarose, commercialisées par la Société Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Suède), conformément à

l'article de Axen et son équipe (publié dans "Acta Chem. Scand", volume 29 (1975), pages 471 à 474), puis est lavé avec une solution de NaHCO_3 à 0,1 M et réduit avec 150 mg de dithiothreitol (dans 15 ml) pendant 45 minutes à $+23^\circ\text{C}$. Le
5 gel est ensuite lavé avec de l'eau distillée, avec une solution-tampon d'acétate de sodium 0,1 M et de NaCl 0,3 M ($\text{pH} = 4,8$) et une solution-tampon d'acétate de sodium 0,1 M et d'éthanol (70 % d'acétate pour 30 % d'éthanol ; $\text{pH} = 4,8$).

La substance est aspirée sur un filtre de verre puis
10 séchée par filtration sous vide, après quoi le gel renfermant alors des groupements HS est mélangé avec 7 ml d'un tampon d'acétate de sodium 0,1 M et de NaCl 0,3 M ($\text{pH} = 4,8$) et 45 mg de (pyridyl-2 dithio)-3 propionate de N-succinimidyle dans 3 ml d'éthanol à 99,5 %. On laisse la réaction se pour-
15 suivre sous faible agitation, à $+23^\circ\text{C}$, pendant 30 minutes, après quoi le gel est aspiré sur un filtre de verre et lavé ensuite avec une solution tampon d'acétate de sodium et d'éthanol (70/30) présentant un pH de 4,8 puis avec de l'éthanol pur (à 99,5 %). Le dérivé d'agarose obtenu est conservé
20 sous la forme d'une suspension dans de l'éthanol à 99,5 %, à une température de $+4^\circ\text{C}$.

Le degré de substitution du dérivé d'agarose par rapport aux groupements esters de N-hydroxysuccinimide est déterminé en exposant le gel à un pH légèrement alcalin (compris entre
25 8 et 10) pendant 60 minutes, après quoi la N-hydroxysuccinimide est libérée et on en détermine spectrophotométriquement la teneur à une longueur d'onde $\lambda = 2600 \text{ \AA}$ ($\epsilon = 8,2 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Le dérivé d'agarose obtenu renferme sensiblement 40 micromoles de groupements esters N-hydroxysuccinimide par gramme de
30 dérivé sec.

Le (pyridyl-2 dithio)-3 propionate de N-succinimidyle peut être préparé de la façon suivante :

On dissout, dans 10 ml d'acétate d'éthyle, 1,9 g (8,6 millimoles) de disulfure dipyridyle-2,2'. On ajoute en-
35 suite au mélange réactionnel goutte à goutte, pendant 15 minutes, sous agitation, une solution de 0,9 g (8,6 millimoles) d'acide mercapto-3 propionique dans 10 ml d'acétate d'éthyle et simultanément 0,5 mg (2 gouttes) de trifluorure de bore dans l'éther. Après 20 heures à température ambiante et sous agita-

tion, le mélange réactionnel est vaporisé (dans un dispositif du type Rotovapor Büchi, à une température inférieure à 40°C), et le résidu solide jaune est mis en suspension dans 10 ml d'acétate d'éthyle froid (+4°C) puis est filtré. On ajoute
5 au filtrat 0,68 g (5 millimoles) de N-hydroxysuccinimide, après quoi 1,3 g (5 millimoles) de dicyclohexylcarbodi-imide, dissous dans 10 ml d'acétate d'éthyle anhydre, y sont ajoutés goutte à goutte, pendant 15 minutes, sous agitation et à température ambiante. On laisse la réaction se poursuivre,
10 sous agitation, pendant 5 heures, à température ambiante, après quoi le mélange réactionnel est refroidi à + 4°C et le dicyclohexylcarbamide ayant précipité est filtré. La solution légèrement jaunâtre est vaporisée et on laisse cristalliser l'huile dissoute dans l'éthanol, à - 20°C. Le rendement est
15 de 45 % et le point d'ébullition du produit obtenu est compris entre 78,5 et 80,5°C.

EXEMPLE 2

Synthèses de trois dérivés de l'agarose renfermant des groupes-
20 acides carboxyliques activés par des liaisons ou ponts disulfures.

I. 7 ml de tampon acétate de sodium 0,1 M, et de chlorure de sodium 0,3 M (pH = 4,8) et une solution de 80 mg de (mercapto-2)propionate de N-hydroxysuccinimidyle, dissous dans 5 ml d'éthanol à 99,5 %, sont ajoutés à 3 g de Thiopropyl-
25 Sepharose 6B séchés sous vide et lavés (produit de marque déposée de la Société Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Suède). On laisse se poursuivre la réaction pendant une heure à température ambiante tout en agitant. Ensuite, le gel est tout d'abord lavé avec un tampon d'acétate de sodium (pH = 4,8)
30 puis avec un mélange d'éthanol et d'eau en proportion 70/30 et finalement avec de l'éthanol pur à 99,5 %. Le gel est conservé sous la forme d'une suspension dans l'éthanol à une température de + 4°C.

II. 7 ml de tampon d'acétate de sodium 0,1 M et de chlorure de sodium 0,3 M (pH = 4,8) et 100 mg d'acide mercapto-3
35 propionique dissous dans 5 ml d'éthanol à 99,5 % sont ajoutés à 3 g de Thiopropyl-Sepharose 6B lavés et séchés (marque déposée). On laisse se dérouler la réaction pendant une heure,

à température ambiante et sous agitation. Le gel obtenu est ensuite lavé avec 2 x 25 ml d'une solution HCl 0,1 M et avec 2 x 25 ml d'acétone additionnée à 5 % d'une solution 0,001 M en HCl. Le gel est ensuite transféré dans un flacon muni d'un
5 agitateur magnétique où l'on ajoute 15,3 ml d'acétone additionnée à 5 % d'HCl 0,001 M. Ensuite, on ajoute encore 250 mg de pyridine-thione et 480 mg de dicyclohexylcarbodi-imide et on laisse le mélange réagir pendant 3 heures à 31°C. A la fin de la réaction, on lavé les produits obtenus avec 2 x 25 ml
10 d'acétone additionnée d'eau à 5 % et avec 15 x 25 ml d'éthanol (à 99,5 %). Le gel est conservé sous la forme d'une suspension dans l'éthanol à une température de + 4°C.

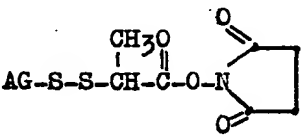
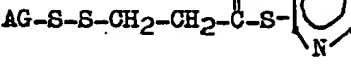
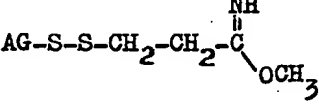
III. 7,0 ml d'un tampon d'acétate de sodium 0,1 M et de chlorure de sodium 0,3 M (pH = 4,8) et 140 ml de chlorhydrate
15 de mercapto-4 butyrimidate de méthyle, dissous dans 5 ml d'éthanol à 99,5 %, sont ajoutés à 3 g de Thiopropyl-Sephadex 6B lavés et séchés (produit de marque déposée). On laisse le mélange réagir pendant une heure et demie à température ambiante et on le lave avec une solution tampon d'acétate de sodium
20 (pH = 4,8) et avec 10 x 25 ml d'éthanol (à 99,5 %) avant de le conserver sous la forme d'une suspension dans l'éthanol à une température de + 4°C.

Les trois dérivés de l'agarose I, II et III, préparés comme indiqué ci-dessus, sont essayés de la façon suivante :

25 Une quantité de gel correspondant à 0,5 g de substance séchée par congélation est lavée avec 12 x 15 ml d'acide chlorhydrique 0,001 M refroidi à la glace puis cette quantité est éliminée par filtration et l'excès de glycylléucine est dissout dans 25 ml d'hydrogène-carbonate de sodium 0,1 N et
30 de chlorure de sodium 0,1 N y est ajoutée dans un tube de centrifugation en matière plastique. On fait chauffer ce tube pendant une heure et demie à température ambiante.

Le gel est lavé sur un filtre de verre avec 3 x 15 ml de tris-(hydroxyméthyl)aminométhane (tampon pH = 8), avec
35 3 x 15 ml de tampon acétate (pH = 4) et 10 à 15 fois avec 15 ml d'eau puis encore 5 à 7 fois avec 15 ml d'acétone. Le gel est séché pendant 24 heures à 80°C.

L'analyse des acides aminés a donné les résultats suivants :

Dérivés	micromoles/g de substance sèche
5 I 	35 à 45
II 	10 à 20
10 III 	0 à 5

AG désigne la matrice d'agarose.

EXEMPLE 3

Synthèse d'un dérivé du verre renfermant des entités ester N-hydroxysuccinimide reliées par des ponts disulfure .

- 15 0,1 g de verre thiolé (produit de marque Corning Thiol CPG 550, commercialisé par la Société Corning Biological Product, Dept, Medfield, Massachusetts, Etats-Unis d'Amérique), correspondant à 0,03 milliéquivalents de groupements thiol/g de produit, dans 1,5 ml d'un tampon (pH = 7,5) de phosphate de sodium 0,1 M et d'HCl 0,3 M sont mélangés avec 0,5 ml de dithiothreitol à 50 millimoles. On laisse se dérouler la réaction de
- 20 réduction pendant 60 minutes à une température de + 25°C. Le dérivé du verre est lavé avec une solution de NaCl 0,3 M (3 x 10 ml) puis on le laisse incuber dans 1,0 ml d'un tampon
- 25 (pH = 4,6) d'acétate de sodium 0,1 M. On ajoute ensuite 0,25 ml de (pyridyl-2 dithio)-3 propionate de N-succinimidyle dans l'éthanol absolu. Après avoir laissé se poursuivre la réaction pendant 60 minutes, à une température de + 25°C, sous agitation, le dérivé du verre est lavé avec un tampon (pH = 4,6) d'acétate
- 30 de sodium 0,1 M, avec de l'eau distillée et avec de l'éthanol

absolu (EtOH à 99,5 %). Le dérivé du verre obtenu (91 mg) est finalement séché sous vide à + 25°C.

5 Le degré de substitution du dérivé du verre vis-à-vis des entités ester N-hydroxysuccinimide est déterminé en exposant ce dérivé à un pH légèrement alcalin (10 mg de dérivé du verre + 2,5 ml d'hydrogène-carbonate de sodium - solution de pH = 9) pendant 60 minutes à + 25°C, le N-hydroxysuccinimide étant libéré et mesuré par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 2 600 Å ($\epsilon = 8,2 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).
10 Le dérivé du verre renferme environ 6 micromoles d'entités esters N-hydroxysuccinimide par gramme de verre sec.

EXEMPLE 4

Synthèse d'un dérivé du dextrane renfermant des entités ester N-hydroxysuccinimide reliées par des ponts disulfures.

15 5 g de dextrane T-70 (produit de la Société Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Suède) sont dissous dans 20 ml d'une solution de soude à 20 % renfermant 1 % NaBH₄. On ajoute 5 g de chlorhydrate de chloro-2 éthylamine au mélange réactionnel que l'on agite ensuite pendant 18 heures à une température
20 de + 90°C. Après l'avoir refroidi à + 25°C et l'avoir neutralisé avec une solution d'acide chlorhydrique 6 M, on élimine par centrifugation la faible quantité ayant précipité. La liqueur surnageante est dialysée avec de l'eau distillée et séchée par congélation.

25 On obtient 5 g de produit sec (amino-éthyl-dextrane). La teneur en azote s'est révélée être de 1,5 %.

On dissout 1 g de l'amino-éthyl-dextrane dans 30 ml de solution-tampon (pH = 9) de borate de sodium 0,05 M et l'on ajoute le (pyridyl-2 dithio)-3 propionate de N-succinimidyle
30 (300 mg dans 30 ml d'éthanol absolu), goutte à goutte, pendant 10 minutes, sous agitation. On laisse se poursuivre la réaction pendant 20 minutes supplémentaires puis on ajoute 3 ml d'acide acétique concentré. Le mélange ainsi obtenu est dialysé avec de l'éthanol à 50 % (3 x 2 000 ml) pendant 48 heures puis
35 évaporé à 15 ml et séché par congélation.

On obtient 1 g de produit sec (pyridyl-2 disulfure de dextrane).

0,12 ml de (pyridyl-2 dithio)-3 propionate de

N-succinimidyle (50 millimoles dans l'éthanol absolu) sont dissous dans 1 ml d'une solution-tampon (pH = 4,6) d'acétate de sodium 0,1 M et de chlorure de sodium 0,3 M. On ajoute 40 microlitres de dithiothreitol 0,05 M au mélange que l'on agite ensuite pendant 30 minutes, puis on y ajoute 20 mg de dextrane de disulfure de pyridyle-2 (voir ci-dessus) dissous dans 1 ml d'une solution-tampon (pH = 4,6) d'acétate de sodium 0,1 M et de chlorure de sodium 0,3 M. Après avoir laissé se poursuivre la réaction pendant 60 minutes à + 25°C, les composants de poids moléculaire faible sont éliminés par filtration sur gel, à savoir sur un produit de marque déposée Sephadex G-25 (perles de dextrane réticulé avec de l'épichlorhydrine, commercialisées par la Société Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Suède), le milieu utilisé étant une solution de chlorure de sodium 0,3 M. La matière extraite (3,0 ml) s'est révélée renfermer environ 6 mg de dérivé de dextrane par ml.

Le degré de substitution du dérivé de dextrane par rapport aux groupements esters N-hydroxysuccinimide est déterminé en exposant ce dérivé à une solution-tampon légèrement alcaline (pH = 9), obtenue en ajoutant 0,1 ml de l'échantillon à 1,9 ml H₂O et à 0,5 ml de NaHCO₃, pendant 60 minutes à + 25°C, le N-hydroxysuccinimide étant libéré et étant mesuré par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 2 600 Å ($\epsilon = 8,2 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Le dérivé de dextrane renferme environ 25 micromoles d'entités N-hydroxysuccinimide par gramme de dérivé sec.

Dans les exemples ci-dessus, on a préparé des dérivés dans lesquels A représente un résidu aliphatique linéaire ou ramifié. Toutefois, un dérivé aromatique peut également être présent dans le groupement A. De façon générale, toutefois, on choisit une chaîne du type alcoylène-(CH₂)_m-, dans laquelle m est un entier compris entre 1 et 6, chaîne alcoylène qui est facultativement substituée par un ou plusieurs groupements alcoyles, le nombre total d'atomes de carbone du groupement A ne dépassant pas 10.

EXEMPLES D'APPLICATION

EXEMPLE A

Utilisation de dérivés de l'agarose renfermant des entités N-hydroxysuccinimide liées par des ponts disulfures, pour as-

surer l'immobilisation d'enzymes et la thiolation de protéines:

20 mg d' α -amylase ("bactérienne du type IIA", quatre fois cristallisée et préparée par la Société américaine Sigma) sont dissous dans 3 ml d'un mélange de NaHCO_3 0,1 M et de NaCl 0,3 M.

La solution d' α -amylase est mélangée avec 3 g de dérivé d'agarose obtenu conformément à l'exemple 1 ci-dessus et est séché par aspiration (sur filtre de verre) et cette solution est tout d'abord lavée avec de l'éthanol à 99,5 % puis avec une solution d'acide chlorhydrique 0,001 M. On laisse la réaction se poursuivre pendant 3 heures à + 23°C sous agitation. Le gel est ensuite lavé avec le mélange précédent (NaHCO_3 0,1 M + NaCl 0,3 M). L'analyse des amino-acides montre que le dérivé de gel renferme 120 mg d' α -amylase par gramme de dérivé sec.

La détermination de l'activité de l' α -amylase du gel avec de l'amidon à 1 % jouant le rôle de substrat montre que l' α -amylase immobilisée présente 30 % de son activité initiale.

Après avoir lavé le produit d'addition de l'agarose et de l' α -amylase soigneusement sur un filtre de verre avec une solution de NaHCO_3 0,1 M et de NaCl 0,3 M, on laisse incubé le produit d'addition avec 3 ml d'une solution de NaHCO_3 0,1 M et de NaCl 0,3 M renfermant 50 mg de dithiothreitol pendant 60 minutes. La substance insoluble est ensuite soumise à une opération d'aspiration sur filtre de verre et le filtrat est filtré sur gel, à savoir sur un produit de marque déposée Sephadex G-25 (perles de dextrane réticulées avec de l'épichlorhydrine et commercialisées par la Société Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Suède), le milieu utilisé étant la même solution-tampon que précédemment. L'analyse de la matière extraite montre qu'elle renferme 90 % de la quantité d' α -amylase attendue (ceci étant déterminé par analyse du produit d'addition du gel et de l'enzyme).

La détermination de la teneur en thiols de l' α -amylase modifiée révèle un degré de substitution de 1,2 moles de groupement SH par mole d' α -amylase.

EXEMPLE B

Utilisation de dérivés du verre renfermant des entités ester

N-hydroxysuccinimide liées par des ponts disulfures pour réaliser l'immobilisation réversible d'une enzyme :

- On dissout 1 mg d' α -amylase (du même type que celle utilisée à l'exemple 1) dans 1,0 ml d'une solution-tampon (pH = 7,5) de phosphate de sodium 0,1 M et de chlorure de sodium 0,3 M. On ajoute à la solution précédente 10 mg d'un dérivé du verre renfermant 0,06 micromoles d'entités esters N-hydroxysuccinimide (préparées conformément à l'exemple 3 ci-dessus). Un essai à blanc ou essai de référence est effectué dans des conditions identiques mais avec un dérivé du verre dans lequel les entités esters N-hydroxysuccinimide ont été hydrolysées (comme décrit au second paragraphe de l'exemple 3) avant d'être mélangées à la solution d' α -amylase.
- On laisse la réaction se dérouler pendant 24 heures à + 23°C tout en agitant. Après sédimentation des dérivés du verre, les liqueurs surnageantes sont décantées et les dérivés du verre sont lavés avec une solution de NaCl 0,3 M. La quantité d' α -amylase immobilisée est déterminée par la mesure de l'activité de l' α -amylase des liqueurs surnageantes et des dérivés du verre (après réduction avec 0,8 ml d'une solution-tampon (pH = 7,5) de phosphate de sodium 0,1 M et de chlorure de sodium 0,1 M et avec 0,2 ml de dithiothreitol 0,05 M pendant 60 minutes à + 25°C). La détermination de l'activité est effectuée en faisant incubier 1,0 ml d'une dilution appropriée de la liqueur surnageante provenant de la réaction d'addition (entre le dérivé du verre et l' α -amylase) et 1,0 ml d'une dilution appropriée de la liqueur surnageante provenant du mélange réactionnel après réduction (rupture) du composé d'addition avec 1,0 ml d'amidon bleu (une tablette d'un produit de marque déposée Phadebas Amylase Test, commercialisée par la Société Pharmacia Diagnostics AB, Uppsala, Suède, en suspension dans 4 ml d'eau distillée) pendant 15 minutes à une température de + 25°C, après quoi on ajoute 0,5 ml d'une solution de NaOH 0,5 M puis on détermine l'extinction de la liqueur surnageante à une longueur d'onde de 6100 Angstroms après avoir laissé se sédimenter l'excès de substrat (résidus de la tablette d'amidon) et les composants insolubles.

Les essais de détermination de l'activité ainsi réalisés montrent que la réaction du dérivé de l' α -amylase avec le

5 dérivé du verre renfermant des groupements esters N-hydroxy-succinimide permet d'obtenir un dérivé renfermant 30 mg d α -amylase par gramme de dérivé sec, tandis que l'absorption non spécifique qui a été déterminée avec le dérivé correspondant du verre ne s'est faite qu'à raison d'environ 1 mg par gramme de verre.

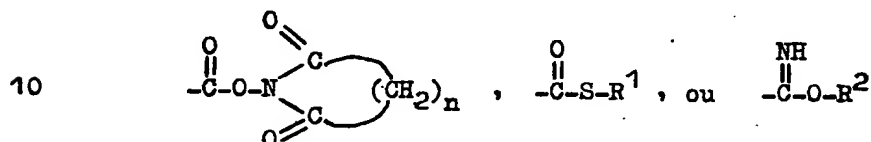
L'invention n'est pas limitée aux exemples de réalisation décrits en détail, car diverses modifications peuvent y être apportées, sans sortir de son cadre.

REVENDICATIONS

- 1 - Produit réactif dérivé de polymères renfermant des groupements HS, caractérisé en ce qu'un certain nombre desdits groupements HS sont transformés en groupements disulfures de
- 5 formule :



dans laquelle A représente un résidu hydrocarboné renfermant de 1 à 10 atomes de carbone, de préférence de 1 à 6 atomes de carbone et dans laquelle Z représente un groupement de formule :



- ou des composés d'addition salés acides des groupements précédemment mentionnés dans lesquels n est égal à 2 ou 3, R¹ représente les groupements pyridyle-2, nitro-5 pyridyle-2 ou
- 15 pyridyle-4 et dans lesquels R² représente le groupement méthyle ou éthyle.

2 - Produit suivant la revendication 1, caractérisé en ce que les polymères sont des polymères insolubles dans l'eau.

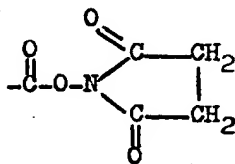
- 3 - Produit suivant l'une des revendications 1 et 2,
- 20 caractérisé en ce que les polymères sont des dérivés de polysaccharides.

4 - Produit suivant l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que les polymères sont des dérivés de l'agarose.

- 5 - Produit suivant l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que les polymères sont réticulés.
- 25

6 - Produit suivant la revendication 5, caractérisé en ce que les polymères réticulés sont insolubles dans l'eau mais gonflent dans l'eau.

- 7 - Produit suivant l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que le groupement Z présente la formule suivante :
- 30



et A représente le groupement de formule $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$.

8 - Application du produit de l'une des revendications 1 à 7 comme agent de formation de thiols et comme vecteur ou support d'enzymes et autres protéines.

DERWENT FR 2382489

- 1/1 WPIL - (C) Derwent
 AN - 1978-65621A [37]
 TI - Reactive derivs. of sulphhydryl contg. polymers - having e.g. carboxy: succinimido-alkylene-di: sulphide gps. and useful as thiolating agents and enzyme supports
 DC - A11 A97 B04 D16
 PA - (PHAA) PHARMACIA FINE CHEM
 IN - AXEN REA; CARLSSON JPE; DREVIN HNY
 NP - 6
 NC - 6
 PN - DE2808539 A 19780907 DW1978-37 *
 - SE7702463 A 19781002 DW1978-42
 X - FR2382489 A 19781103 DW1978-49
 - JP53130781 A 19781115 DW1978-51
 - US4175073 A 19791120 DW1979-48
 - GB1597757 A 19810909 DW1981-37
 PR - 1977SE-0002463 19770304
 IC - C07G-007/00 C08B-031/08 C08B-037/12 C09K-003/00 C12N-011/06
 AB - DE2808539 A
 Reactive derivs. (I) of HS-gp. contg. polymers (II) in which a proportion of the HS are converted to -S-S-AZ are new. In the formula A=1-10, esp. 1-6C hydrocarbyl. Z is COSR1 or C(NH). OR2 (or its acid addition salt), n=2 or 3. R1=4- or 2-pyridyl or 5-nitro-2-pyridyl. R2=CH3 or C2H5. Most esp. A is CH2CH2 and Z is COO (succinimido).
 - (II) are pref. water soluble but may be crosslinked insoluble polymers provided these are swellable in water. Esp. they are polysaccharide, esp. agarose, derivs.
 - (I) are useful as solid-phase thiolating agents permitting easy sepn. of thiolated from unthiolated material and selective reaction of particular NH2 gps. They are also useful as carriers for enzymes and other proteins; when the bound enzyme is spent it can be reductively cleared and washed away so that the carrier can be reused after activation.
 AC - CPI: A10-E01 A12-W11 B04-B02C B04-B04A B04-C02 B11-B D05-A01
 JP - 1978-37
 JE - 1978-42; 1978-49; 1978-51; 1979-48; 1981-37